

Fermentasi Etanol dengan Bahan Baku Produk Sakarifikasi Singkong oleh *Aspergillus niger* dengan Menggunakan Isolat *Saccharomyces* spp. (NKB dan NKC)

TITIN HERAWATI¹, THERESIA TRI SUHARNI¹

¹Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada
Jl. Teknika Selatan Sekip Utara Sleman Yogyakarta 55281
email : eraw_tihee@yahoo.com

ABSTRACT

Nowdays the production of petroleum energy resource decreases in every years. Ethanol is one of renewable source of energy, it can substitution of fossil fuel. Ethanol can be produced from fermentation by *Saccharomyces*. The raw material of ethanol fermentation is carbohydrate rich organic. Cassava is one of efficient based material for ethanol fermentation because of its attainable price and availability. The objectives of this study were to isolation yeast from coconut neera, and use the isolate as microbial ethanol fermentation from cassava.

The research was started with isolating yeast from coconut neera, and then how to identified the yeast isolates by morphological and physiological characteristic. Then next process was saccharification the cassava by *Aspergillus niger*. Product of saccharification added by molasses to obtain 10% and 15% reducing sugar content and subjected for ethanol fermentation. The product of fermentation was analysed for the ethanol concentration by the Conway microdiffuse and GCMS method, Reducing sugar concentration was determined by DNS method, total yeast was determined by spectroscopy method and pH was determined by pH meter.

The result showed that the isolation from coconut neera get 4 yeast isolate *Saccharomyces* spp. namely NKA, NKB, NKC, and NKD. The NKB and NKC isolates were chosen as candidate being used for ethanol fermentation process. The process saccharification produced 8,43% of reducing sugar. The result of ethanol fermentation process from the product saccharification of cassava and molasse mixture with content 10 % of reducing sugar were: NKB 4,19% and NKC 5,19 %. Whereas the result ethanol fermentation from the product saccharification of cassava and molasse mixture with content 15 % of reducing sugar were: NKB 6,75% and NKC 6,34 %.

Based on this study, it can be concluded that mixed of the product saccharification process by cassava and molasse can be used as raw material fermentation process of ethanol by *Saccharomyces* spp. isolate NKB and NKC which are to isolate from coconut neera.

Keywords: cassava, ethanol fermentation, molasses, saccharification, *Saccharomyces* spp.

PENDAHULUAN

Makin menipisnya cadangan minyak bumi dunia dari tahun ke tahun menyebabkan harga kerosin terus naik. Jalur distribusi dalam negeri yang tidak merata juga menjadi kendala lain ketersediaan kerosin bagi masyarakat daerah terpencil. Disamping itu, efek lingkungan pembakaran hidrokarbon telah membangkitkan kesadaran moral untuk pengembangan teknologi bahan bakar baru, misalnya etanol (Sugiyono, 1995). Etanol merupakan salah satu sumber energi terbarukan yang telah digunakan sejak zaman purba untuk bahan bakar lampu dan untuk memasak. Etanol memiliki kelebihan

dibandingkan dengan bahan bakar fosil. Etanol mengandung 35 % oksigen sehingga dapat meningkatkan efisiensi pembakaran. Etanol juga ramah lingkungan karena emisi gas buangnya rendah kadar CO, NO_x, gas rumah kaca seperti CO₂, serta logam berat dan senyawa karsinogenik. Etanol mudah terurai dan aman karena tidak mencemari air. (Hidayat, 2006). Hanya saja selama masa keemasan bahan bakar fosil dari perang dunia kedua hingga tahun 1980, peran bahan bakar berbasis biomassa tergantikan karena tidak didukung oleh pengembangan kebijakan teknologi dan politik (Soerowidjaja, 2003).

Fermentasi etanol umumnya dilakukan oleh beberapa golongan khamir *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* dan *Candida* serta beberapa golongan bakteri *Zymomonas*. Namun fermentasi etanol oleh khamir dari golongan *Saccharomyces* lebih umum digunakan, karena khamir ini mampu memproduksi enzim yang aktif dalam perubahan glukosa menjadi etanol (Becker and Eckhard, 2003). Beberapa khamir dapat diisolasi dari nira kelapa karena kandungan gula dalam nira kelapa berkisar 7,5-20% yang memungkinkan mikrobia untuk melakukan fermentasi alkohol secara spontan (Borse, *et al.*, 2006).

Bahan baku fermentasi etanol berupa bahan organik kaya karbohidrat seperti gula tebu, nira, beras, singkong, bahkan limbah pertanian dan kehutanan dengan kadar selulosa tinggi. Singkong merupakan salah satu bahan baku fermentasi etanol yang efisien karena murah dan mudah didapat. Fermentasi berbahan dasar karbohidrat akan menghasilkan etanol, laktat, propionat, format, butirat, *succinate*, *caproate*, asetat, n-butanol, 2,3 butanadiol, acetone, 2-propanol, karbondioksida dan molekul hidrogen. Oleh karena itu fermentasi diklasifikasikan menjadi fermentasi etanol, fermentasi asam laktat, fermentasi asam propionik, fermentasi asam formik, fermentasi asam butyrik, fermentasi asam asetat (Hans, 1993).

Berdasarkan latar belakang tersebut, isolasi khamir dari nira kelapa dapat dilakukan dan dapat digunakan sebagai mikrobia pemfermentasi etanol dari bahan singkong. Peluang ini akan memberikan solusi bagi masyarakat untuk mendapatkan isolat khamir dari bahan alami dan cara memproduksi etanol dari bahan singkong serta menjadikannya sebagai alternatif dalam menghadapi krisis energi. Oleh karena itu penelitian mengenai "Fermentasi Etanol Berbahan Baku Produk Sakarifikasi Singkong oleh *Aspergillus niger* dengan Menggunakan Isolat *Saccharomyces* spp." penting dilakukan.

METODE

Isolasi Khamir dari Nira kelapa. Isolasi khamir dari nira kelapa dilakukan dengan melalui kultur diperkaya yaitu dengan

menginokulasikan 3 ml nira kelapa ke dalam 30 ml media diperkaya (enrichment), diinkubasi selama 24 jam pada temperatur 30°C. Setelah 24 jam, 1ml kultur cair ditanam secara taburan ke dalam petridish steril dengan medium YME agar, diinkubasi pada suhu kamar selama 48 jam (Vongsuwanlet *et.al.*, 1981). Purifikasi dilakukan dengan goresan pada petridish steril dalam medium YME agar untuk mendapatkan koloni sel tunggal (*single cell colony*) (Singleton and Sainsbury, 1981).

Identifikasi Isolat Khamir. Identifikasi dilakukan dengan pengamatan morfologi dan pengujian sifat fisiologis.

Preparasi bahan fermentasi dan proses sakarifikasi bahan. Pada tahap ini dilakukan preparasi sampel singkong sebagai bahan baku fermentasi. Singkong yang diperoleh dari pasar Kranggan sebanyak ± 1500 mg dipotong kecil-kecil dan dibuat bubur dengan diblender dan penambahan air sampai volume 3000 ml. Selanjutnya dilakukan penyaringan dan diambil patinya. Sampel 60 gram pati singkong dan ditambahkan medium Yeast ekstrak 2,5 gr; KH_2PO_4 0,5 gr; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2,5 gr; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,025 gr; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,075 gr; dan air sampai volume 500 ml, bahan disterilisasi dengan autoclave 121°C, 1 atm selama 15 menit. kemudian diinokulasikan *Aspergillus niger* dan dilakukan inkubasi dengan suhu 30 °C selama ± 7 hari dan pemutaran 150 rpm. Selanjutnya dilakukan penyaringan sebanyak 3 kali (penyaringan terakhir dengan Whatman no 1). Selanjutnya dilakukan pengukuran pH dan kadar gula reduksi.

Proses fermentasi etanol. Larutan hasil sakarifikasi dituang ke dalam botol sampel. Selanjutnya dilakukan penambahan molasse untuk mendapatkan kadar gula sampai 10% dan 15% (dengan perbandingan hasil sakarifikasi singkong: molasse yang sudah diencerkan 1:1), KH_2PO_4 1 gr/l; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 gr/l dan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 gr/l, dengan pH 5. Selanjutnya bahan disterilisasi dengan autoclave 121°C, 1 atm selama 15 menit. Selanjutnya difermentasikan pada kultur batch menggunakan isolat Khamir *Saccharomyces*.

Analisis berat kering singkong dan Kadar air singkong. Berat kering singkong ini

diukur dengan meletakkan sampel singkong dalam botol timbang dan diletakkan dalam oven suhu 70°C sampai berat singkong konstan. Kadar air singkong dihitung berdasarkan prosentase berat kering singkong yang dihasilkan terhadap berat basah sampel.

Analisis gula reduksi. Analisis gula reduksi menggunakan metode DNS yaitu 1 ml larutan standar maupun sampel masing-masing ditambahkan 1 ml H₂O dan 3 ml larutan DNS, digojog sampai homogen dan dimasukkan ke dalam waterbath selama 15 menit. Masing-masing tabung dipindahkan ke tabung Coleman dan diamati *optical density* dengan spektrofotometer λ 540 nm. Dan kemudian dianalisis kadar gula reduksinya.

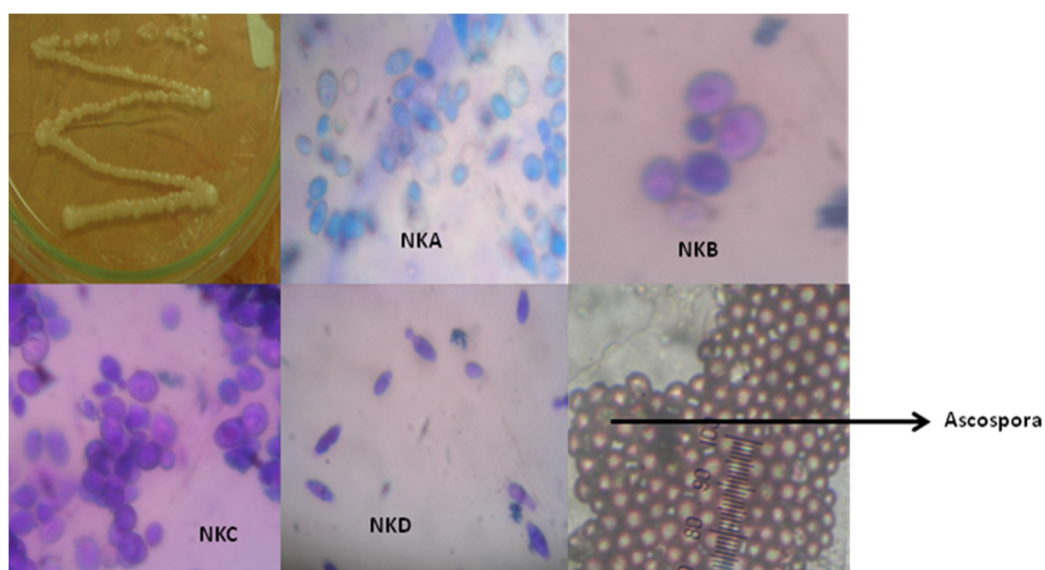
Analisis kadar etanol. Analisis kadar etanol menggunakan metode Conway yaitu 1 ml K₂CO₃ jenuh diletakkan pada bagian B, 1 ml larutan kalium dikromat diletakkan pada bagian A, dan 1 ml larutan alkohol standar atau sampel diletakkan pada bagian C. Alat Conway ditutup dan diinkubasi pada temperatur 30°C selama 2 jam. Larutan A diencerkan menjadi 10 cc, setelah itu diamati pada spektro λ 480 nm.

Analisis Hasil. Data penelitian berupa konsentrasi alkohol, dan gula reduksi pada variasi isolat khamir dianalisis menggunakan uji statistik *t-Test berpasangan* dengan aplikasi program komputer *SPSS for Windows* versi 12.

HASIL

Isolasi dan Identifikasi Khamir dari Nira kelapa. Pada penelitian ini diperoleh 4 isolat yaitu NKA, NKB, NKC, NKD. Pemberian nama isolat tersebut berdasarkan asal isolat tersebut diperoleh yaitu dari nira kelapa dan aktivitasnya dalam memfermentasi gula menjadi etanol. Isolat-isolat tersebut diperoleh dari proses inokulasi nira kelapa ke dalam medium diperkaya yang mengandung 3% etanol. Hal ini bertujuan agar khamir-khamir yang mampu melakukan fermentasi etanol dan dapat bertahan hidup pada media yang mengandung etanol dapat tumbuh dan dapat diisolasi.

Isolat khamir yang diperoleh, terlihat sedang melakukan budding secara multilateral yang merupakan salah satu cara perbanyakan diri secara vegetatif dengan melakukan pertunasan di beberapa bagian permukaan sel induknya. Kebanyakan anggota dari khamir juga melakukan reproduksi secara seksual dengan pembentukan spora seksualnya. Golongan khamir *Ascomycetes* akan membentuk askospora, *Saccharomyces* merupakan salah satu golongan khamir *Ascomycetes*. Untuk memperoleh spora seksual pada khamir golongan *Saccharomyces* direkomendasikan menggunakan medium acetat agar (Walker, 1998).



Gambar 1. Bentuk koloni, sel dan ascospora dari khamir isolat NKA, NKB, NKC, NKD hasil isolasi dari nira kelapa (Herawati, 2008)

Tabel 1. Karakter-karakter identifikasi khamir hasil isolasi dari nira kelapa

Karakter yang diamati	Isolat khamir				
	<i>Saccharomyces</i>	NKA	NKB	NKC	NKD
1. Hidrolisis Urea	-	-	-	-	-
2. Medium cair					
a. <i>pelicle</i>	-	-	-	-	-
b. sedimen	+	+	+	+	+
3. Medium Padat					
a. Profil					
smooth	+	+	+	+	+
b. Margin					
Entire	+	+	+	+	+
c. Warna					
Krem	+	+	+	+	+
4. Fermentasi					
a. Glukosa	+	+	+	+	+
b. Fruktosa	+	+	+	+	+
c. Sukrosa	+	+	+	+	+
d. Galactosa	v	+	+	+	+
e. Lactosa	-	-	-	-	-
f. Maltosa	v	-	-	-	-
g. Raffinosa	+	+	+	+	+
5. Pertumbuhan dalam					
a. 5 % Glukosa	+	+	+	+	+
b. 50% Glukosa	+	+	+	+	+
6. Pencairan Gelatin	-	-	-	-	-
7. Pembentukan amyloid pada medium starch	-	-	-	-	-
8. Asimilasi sumber karbon					
a. Glukosa	+	+	+	+	+
b. D-Xylosa	-	-	-	-	-
c. Sukrosa	v	-	-	-	-
9. Asimilasi sumber Nitrogen					
a. (NH ₃) ₂ SO ₄	-	-	-	-	-
b. NaNO ₃	-	-	-	-	-
c. KNO ₃	-	-	-	-	-
10. Bentuk sel reproduksi vegetatif					
multilateral bud	+	+	+	+	+
11. Bentuk sel spora (Reproduksi generatif)					
a. Bentuk Asci					
Spheroidal	+	+	+	+	+
b. Jumlah ascospora					
1-4	+	+	+	+	+
c. Letak Asci					
central	+	+	+	+	+
d. Formasi asci					
Unconjugated ascus	+	+	+	+	+
Penghasilan etanol (%)		0,69	0,79	0,83	0,61

Keterangan :

+ : memiliki kemampuan, ada

- : tidak memiliki kemampuan, tidak ada

NKA, NKB, NKC, NKD : isolat *Saccharomyces* hasil isolasi dari nira kelapa dengan variasi ukuran diameter koloni 0,05 cm, 0,1 cm, 0,3 cm, 0,4 cm.

Fermentasi etanol berbahan baku campuran produk sakarifikasi singkong dan molasse. Sebelum singkong digunakan untuk proses fermentasi dilakukan terlebih dahulu proses sakarifikasi. Proses sakarifikasi ini bertujuan untuk mengubah pati yang terkandung dalam singkong menjadi gula reduksi (terutama glukosa) dengan bantuan enzim amiloglukosidase yang diproduksi oleh *Aspergillus niger*.

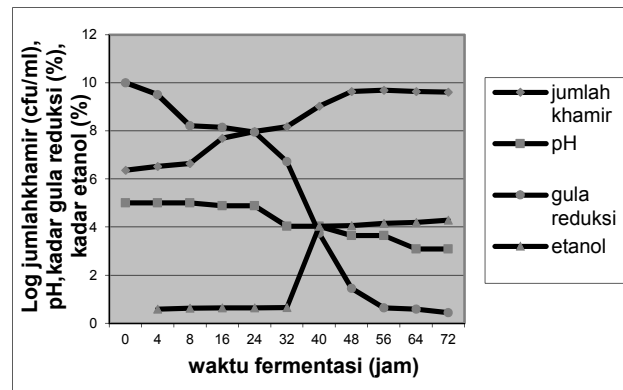
Tabel 2. Biomassa *Aspergillus niger*, kadar gula reduksi dan pH selama proses sakarifikasi singkong

Waktu	Biomassa <i>Aspergillus niger</i>	Kadar gula reduksi	pH
Hari 0	0,12 mg/ml	0,11%	5
Hari 2	-	0,4%	5
Hari 4	-	2,85%	5
Hari 6	-	8,29%	4,5
Hari 7	17,5 mg/ml	8,43%	4,5

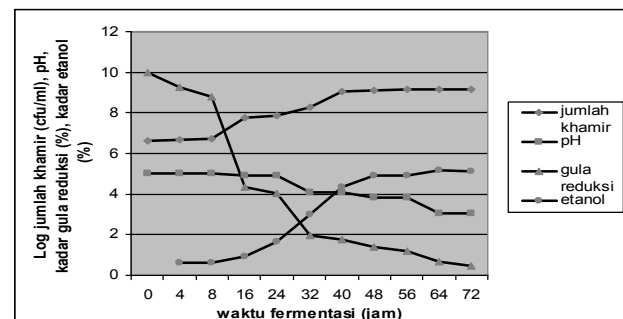
Pada proses awal sakarifikasi sudah terdapat gula reduksi sebesar 0,11%. Selanjutnya bubur pati singkong diinokulasi *Aspergillus niger* sebanyak 0,12 mg/ml. Setelah 7 hari, proses sakarifikasi tersebut menghasilkan gula reduksi paling maksimal yaitu sebesar 8,43% dengan jumlah biomassa *Aspergillus niger* sebanyak 17,5 mg/ml (Tabel 2).

Untuk melakukan proses fermentasi harus mengetahui fase-fase pertumbuhan (fase lag, fase eksponensial, dan fase stationer) dari isolat khamir yang digunakan.

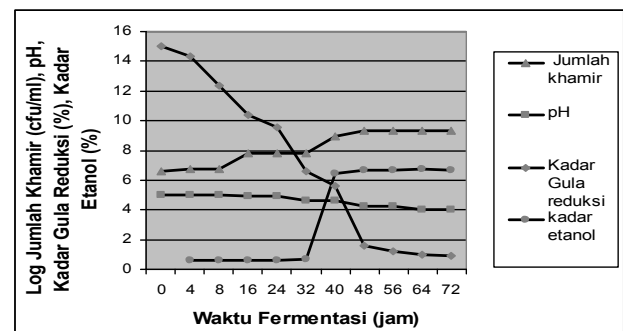
Isolat NKB dalam medium campuran produk sakarifikasi singkong+molasse 10% mulai mengalami fase eksponensial pada jam ke 32 sampai jam ke 56 (Gambar 3). Pada jam ke 56 merupakan waktu khamir mulai mengalami fase stationer, namun penghasilan etanol masih mengalami kenaikan. Pada akhir fermentasi yaitu jam ke 72 dengan jumlah khamir $4,02 \times 10^9$ dihasilkan etanol sebesar 4,28%, sisa gula reduksi sebesar 0,44%, dan pH 3,08. Isolat NKC dalam medium campuran produk sakarifikasi singkong+molasse 10% mulai mengalami fase eksponensial pada jam ke 24 sampai jam ke 48 (Gambar 4).



Gambar 3. Kurva pertumbuhan khamir isolat NKB pada medium yang mengandung 10% gula



Gambar 4. Kurva pertumbuhan khamir isolat NKC pada medium yang mengandung 10% gula

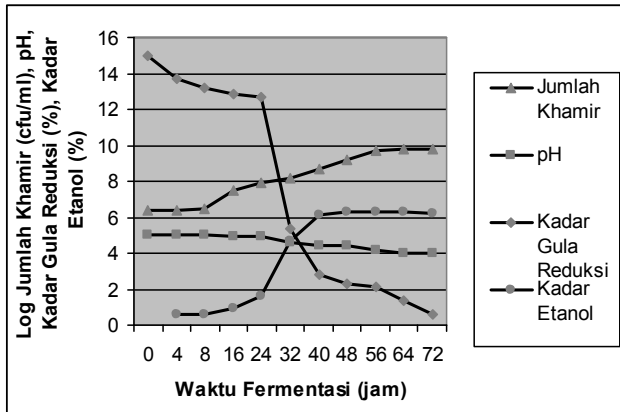


Gambar 5. Kurva pertumbuhan khamir isolat NKB pada medium yang mengandung 15% gula

Pada jam ke 48 merupakan waktu khamir mulai mengalami fase stationer, namun penghasilan etanol masih mengalami kenaikan. Pada akhir fermentasi yaitu jam ke 72 dengan jumlah khamir $1,52 \times 10^9$ dihasilkan etanol sebesar 5,12%, sisa gula reduksi sebesar 0,48%, dan pH 3,06.

Isolat NKB dalam medium campuran produk sakarifikasi singkong+molasse 15% mulai mengalami fase eksponensial pada jam

ke 32 sampai jam ke 48 (Gambar 5). Pada jam ke 48 merupakan waktu khamir mulai mengalami fase stationer. Pada akhir fermentasi yaitu jam ke 72 dengan jumlah khamir $2,12 \times 10^9$ dihasilkan etanol sebesar 6,67 %, sisa gula reduksi sebesar 0,89%, dan pH 4,01.



Gambar 6. Kurva pertumbuhan khamir isolat NKB pada medium yang mengandung 15% gula

Tabel 3. Kecepatan pertumbuhan spesifik (μ), Yield produk terhadap substrat (Y p/s) dan efisiensi pembentukan etanol saat fase eksponensial

Isolat khamir	Kadar gula dalam medium	μ	Y p/s	Efisiensi pembentukan etanol
NKB	10%	0,137	0,354	65,09%
	15%	0,127	0,397	69,41%
NKC	10%	0,139	0,419	67,92%
	15%	0,137	0,390	65,67%

Isolat NKC dalam medium campuran produk sakarifikasi singkong+molasse 15% mulai mengalami fase eksponensial pada jam ke 32 sampai jam ke 56 (Gambar 6). Pada jam ke 56 merupakan waktu khamir mulai mengalami fase stationer, namun penghasilan etanol masih mengalami kenaikan. Pada akhir fermentasi yaitu jam ke 72 dengan jumlah khamir $5,89 \times 10^9$ dihasilkan etanol sebesar 6,21 %, sisa gula reduksi sebesar 0,61%, dan pH 4,03.

Tabel 4. Hasil GCMS produk fermentasi etanol pada jam ke 64

Isolat Khamir	Kadar gula dalam medium	Senyawa yang terdeteksi	Kadar / Area (%)
NKB	10%	1. Mono fluoroacetylene	0,78
		2. Acetone	9,03
		3. Etanol (1)	80,77
		4. 7-Hydroxy-7-Phenyl-3,9-diisopropyl-2,10-dioxadispiro (3.3.3.1) dodecan-1,11-dione	0,71
NKB	15%	5. Etanol (2)	8,71
		1. Etanol (1)	9,73
		2. Isopentanol	1,01
NKC	10%	3. Asam asetat	1,60
		1. Etanol (1)	62,33
		2. Etanol (2)	27,58
		3. Etanol (3)	5,96
NKC	15%	4. Asam asetat	4,13
		1. Etanol (1)	91,69
		2. Etanol (2)	5,78
		3. Isoamylol	1,64
		4. Asam asetat	0,89

PEMBAHASAN

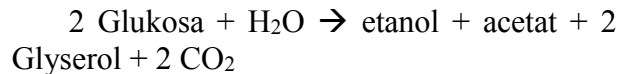
Isolat khamir yang diperoleh tidak memiliki kemampuan menghidrolisis urea (Tabel 1) , karakter ini digunakan untuk identifikasi awal khamir tersebut termasuk dalam golongan *Ascomycetes*, karena hanya khamir dari golongan *Basidiomycetes* yang memiliki kemampuan untuk menghidrolisis urea dengan ditandai terbentuknya warna kemerahan pada medium yang mengandung urea. Isolat khamir tersebut memiliki kemampuan untuk memfermentasikan glukosa, sukrosa, fruktosa, galaktosa dan rafinosa dengan ditandai adanya perubahan warna medium dari biru kehijauan menjadi kuning dan terbentuk gelembung udara pada tabung durham. Selain itu khamir tersebut juga

memiliki kemampuan untuk mengasimilasi sumber karbon berupa glukosa, mampu tumbuh pada medium yang mengandung kadar glukosa 5% dan 50%. Berdasarkan karakter-karakter yang diamati dalam identifikasi, khamir hasil isolasi dari nira kelapa ini termasuk dalam genus *Saccharomyces*.

Penggunaan gula reduksi selain untuk proses fermentasi juga digunakan untuk pemenuhan energi dalam perbanyakan sel. Dari Tabel 3 terlihat bahwa kecepatan pertumbuhan spesifik pada NKB lebih tinggi daripada NKC sehingga gula reduksi yang diubah menjadi etanol juga lebih kecil (dari nilai $Y_{p/s}$ dan efisiensi pembentukan etanol). Sedangkan isolat NKB bekerja lebih optimal dalam proses fermentasi pada medium campuran produk sakarifikasi singkong+molasse 15% daripada isolat NKC. Hal ini dikarenakan pada isolat NKC penggunaan gula reduksi selain untuk proses fermentasi juga digunakan untuk pemenuhan energi dalam perbanyakan sel.

Proses fermentasi etanol oleh isolat NKB dan NKC dalam medium campuran produk sakarifikasi singkong+molasse 10% dan 15% efektif pada jam ke 64, namun pada jam tersebut juga terjadi penurunan nilai pH ke arah asam, mulai terbentuk asam organik lain selain produk etanol. Oleh karena itu hasil fermentasi etanol pada jam ke 64 selanjutnya diuji dengan GCMS (Tabel 4). Produk akhir selain etanol tersebut akan mempengaruhi kemampuan khamir dalam proses fermentasi etanol sehingga kadar etanol yang dihasilkan tidak maksimal (Ingledew, 2006).

Menurut Prescott and Dunn (1959) produk akhir selain etanol atau sering disebut sebagai fusel oil akan ikut terbentuk dalam proses fermentasi, antara lain berupa campuran amyl dan isoamyl alkohol, isobutyl, propyl alkohol, produk asam, ester, dan aldehyd. Terbentuknya fusel oil dipengaruhi oleh jenis bahan dasar yang digunakan dan jenis mineral yang ditambahkan dalam proses fermentasi. Penambahan alkali (NaHCO_3 , Na_2HPO_4) menyebabkan terbentuknya formasi glyserol karena acetaldehyd mengalami dismutasi menjadi etanol dan asetat dan dikarenakan tidak berfungsinya aseptor hydrogen dalam proses fermentasi (Hans, 1993).



Oleh karena itu untuk menghilangkan fusel oil dalam produk etanol hasil fermentasi, maka dilakukan proses destilasi.

KESIMPULAN

1. Empat isolat *Saccharomyces sp.* berhasil diisolasi dari nira kelapa. Dua diantara keempat isolat khamir tersebut digunakan untuk proses fermentasi etanol yaitu NKB dan NKC.
2. Proses sakarifikasi singkong menggunakan *Aspergillus niger* menghasilkan gula reduksi sebesar 8,43%.
3. Proses fermentasi berbahan dasar campuran produk sakarifikasi singkong+molasse 10% pada jam ke 64 menghasilkan etanol: isolat NKB 4,19%, NKC 5,19%. Sedangkan pada medium campuran produk sakarifikasi singkong+molasse 15% menghasilkan etanol : isolat NKB 6,75%, NKC 6,34%

DAFTAR PUSTAKA

- Becker J and Eckhard B. 2003. A Modified *Saccharomyces cerevisiae* Strain that Consumes L-Arabinose and Produces Ethanol. *Applied and Environmental microbiology*. <http://journal.asm.org>. Diakses 16 juni 2007.
- Borse BB, Lingamallu JMR, Kulathooram R, Bashyam R. 2006. Chemical Composition of Volatiles from Coconut Sap (Neera) and Effect of Processing. <http://www.sciencedirect.com>. Diakses 5 Mei 2007.
- Hans GS. 1993. *General Microbiology* 7th ed. New York: Cambridge University Press. pp 290-299.
- Hidayat D. 2006. Bensin dioplos Singkong. <http://cdc.eng.ui.ac.id>. Diakses 22 Maret 2006.
- Ingledew WM. 2006. Improvement in Alcohol Technology Through Advancements in Fermentation Technology. <http://www.journal.asm.org>. Diakses 4 Oktober 2007.
- Prescott SC and Dunn CG. 1959. *Industrial Microbiology* 3th ed. Japan: Mc Graw-Hill Book Company, Inc. pp 102-109.

Skinner FA, Susan MP, and Davenport RR.
1980. *Biology and Activities of Yeast*.
New York: Academic Press. pp 33-43, 103

Sugiyono A. 1995. Proses Hydrocarb untuk
Biomassa dan Bahan Bakar Fossil.
*Prosiding Prospek Pengembangan
Biomassa sebagai Sumber Energi di*

Indonesia. Jakarta: INNERTAP-
Indonesia. hal 83-90.

Soerowidjaja TH. 2003. Kendala
Pengembangan Bisnis Energi Biomassa
dan Solusinya. Pusat Penelitian Material
dan Energi Lembaga Penelitian ITB.
Bandung: ITB. hal 1-5.